

氏 名 (本籍)                    <sup>さい</sup>齋                    <sup>き</sup>木                    <sup>ひで</sup>秀                    <sup>かず</sup>和

学 位 の 種 類                    博                    士 (薬                    学)

学 位 記 番 号                    薬 博 第                    3 2 5                    号

学位授与年月日                    平 成 15 年 3 月 24 日

学位授与の要件                    学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻                    東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 創薬化学専攻

学 位 論 文 題 目

高分子交互累積膜を利用した選択透過膜の調製とバイオセンサへの  
応用

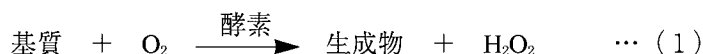
論 文 審 査 委 員                    (主 査) 教 授 安 齋 順 一

教 授 井 戸 達 雄

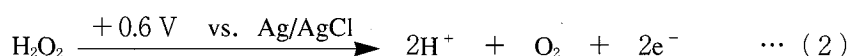
教 授 竹 内 英 夫

## 論文内容要旨

過酸化水素検出型バイオセンサの多くは、式1の反応を触媒する酸化酵素を分子認識素子として用いる。

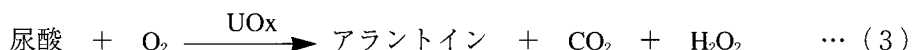


過酸化水素の生成速度は酵素量が十分に多いときには基質（被検物質）濃度と比例関係にあるため、過酸化水素を電極上で酸化して得られる応答電流から、測定試料中の基質濃度を測定することが可能である（式2）。



従って、過酸化水素と同程度もしくはより低い酸化電位を持つ物質が共存する系では、基質を特異的に検出することができない。例えば、臨床分析などで生体試料を分析対象物とした場合、ビタミンC（VC）、尿酸（UA）およびアセントアミノフェン（AA）などは過酸化水素が酸化される電位において容易に酸化されるため過酸化水素検出型バイオセンサに妨害を与える。これらの影響を除去するためには、これらの物質が電極上へ到達することを阻止する必要がある。

そこで本研究では高分子交互累積膜（PEM）法を用いて、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 選択透過膜（妨害除去膜）を電極に被覆し、さらに式3の反応を触媒するウリカーゼ（UOx）を固定化し、測定溶液中の還元性物質の影響を受けない $\text{H}_2\text{O}_2$ 検出型尿酸センサの作製と評価を行った。



本法は、高分子電解質同士の静電的相互作用を利用した交互累積膜作製技術であり、形成される累積膜はナノメートルレベルと極めて薄いため、膜透過性に起因する応答遅延と出力低下を最小限にとどめることができると考えられる。また、用いる高分子電解質の種類および作製条件により累積構造を任意に制御可能であることから、膜の物質透過特性を制御することも可能になると考えられる。

本研究では妨害除去膜の作製に、カチオン性高分子としてポリアリルアミン（PAA）、ポリエチレンイミン（PEI）およびポリジアリルジメチルアミン（PDMA），アニオン性高分子としてポリビニル硫酸（PVS）とポリスチレンスルホン酸（PSS）を使用した。PAAは1モノマー単位当たり1つの1級アミンを持つ直鎖状高分子であり柔軟な構造を持つ。PEIは1級アミン：2級アミン：3級アミン＝1：2：1の割合で含有する分岐状高分子である。PDMAは4級アミンを持ち、PAAと同様に直鎖状高分子であるが分子内に環状構造を持つため、立体的な構造変化が制限された剛直な構造をとる。また、PVSとPSSは $-\text{SO}_3^-$ を持つ強電解質性高分子であるが、PSSは分子内に芳香環を持つためPEMとした時の積層状態が、PVSを

用いた場合と異なると予想される。そこで本研究では、これらの種々の高分子電解質溶液を用いて、電極状態に高分子電解質を累積しPEMとした。

まずPAAとPVSで調製した高分子交互累積膜を白金電極上に形成し、得られた修飾電極による $\text{H}_2\text{O}_2$ の選択的検出について検討を行った。未修飾白金電極の場合、0.1mM VC, UAおよびAAの+0.6V vs.Ag/AgClに対する応答電流は、それぞれ過酸化水素に対する応答比でVC;51%, UA;65%, AA;43%となり、過酸化水素の選択的検出ができないことは明らかである。これに対して、D-PBSにて調製したPAA/PVS累積膜では4層積層することで、過酸化水素に対する応答比でVC, UAおよびAAの応答を1%以下にまで減少させることができた。また、蒸留水で調製した累積膜のVC, UAおよびAAに対する応答は、過酸化水素に対する応答比で約5%まで減少した。これらの結果は、過酸化水素の分子サイズがVC, UAおよびAAに比べて小さいため、過酸化水素のみが選択的に(PAA/PVS)<sub>2</sub>累積膜を透過できたためと考えられる。これらの結果から、(PAA/PVS)<sub>2</sub>累積膜を用いて過酸化水素選択透過膜の作製が可能となった。しかし、ポリマー溶液のイオン強度の違いによって(PAA/PVS)<sub>2</sub>膜の過酸化水素選択性に差が見られた。イオン強度の高いD-PBSを用いて調製した累積膜は蒸留水で作製した場合よりも膜厚が厚くなり比較的密な状態で膜が形成されていると考えられる。その結果として、D-PBSと蒸留水で作製したPEMでは過酸化水素選択透過性に違いが生じたと考えられる。

続いて、PAA/PSS, PEI/PVSおよびPDDA/PVS累積膜の積層数と各還元性物質の応答電流の関係について評価した。PAA/PSS累積膜をD-PBSで調製した場合、各物質に対してPAA/PVS累積膜と同様の透過制限作用を示し、4層累積することで過酸化水素に対する応答比でVC, UAおよびAAの応答を約5%程度にまで減少させることができた。PAA/PVS累積膜と比較すると透過制限作用はやや低かったが、PAA/PSS累積膜も過酸化水素選択透過膜として利用できた。このPAA/PVS累積膜とPAA/PSS累積膜の透過性の違いは用いるポリアニオンの構造の違いによると考えられる。PSSはPVSと同じく直鎖状高分子であるが、分子内に芳香環を持つため累積膜とした場合比較的疎な状態で累積され、物質に対する透過性が高くなったと考えられる。次にPEI/PVS累積膜およびPDDA/PVS累積膜の各物質に対する応答電流から物質の透過性を評価した。(PEI/PVS)<sub>2</sub>PEI累積膜では過酸化水素に対する応答比でVC, UAが約80%, AAが約27%となった。さらに積層数を増加させてもVC, UAおよびAAに対する応答は過酸化水素の応答と比較して無視できるものではなく、PEI/PVS累積膜は過酸化水素選択透過性を示さなかった。PDDA/PVS累積膜を用いた場合には応答電流の減少が観察されなかった。これらの結果は、PEI/PVSおよびPDDA/PVS累積膜修飾電極では過酸化水素の選択的検出ができないことを示している。また、D-PBSにて調製した(PAA/PVS)<sub>2</sub>累積膜修飾電極を用いて過酸化水素に対する検量線を作製したところ、VCとUA存在下において $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 以上の $\text{H}_2\text{O}_2$ が測定可能であった。これらの結果はPAA/PVS膜が電流測定型バイオセンサに適用可能であることを示唆している。

次に、作製した過酸化水素選択透過膜のバイオセンサへの適用について評価した。本研究ではモデル酵素として尿酸酸化酵素(UOx)を用いた。UOxは等電点が5.6で、pH7.0-11.0では安定である。従って中性から弱塩基性領域では、正の電荷を有する高分子電解質(PAAやPEI)とPEMを作製することが可能と

なる。また、UOxは式3の反応を触媒するので、生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を電極上で検出することにより基質であるUAの濃度を評価することができる。しかし、UAは過酸化水素が電極上で酸化される電位において容易に酸化され電流が流れるため、UA自身が測定への妨げとなる。そこで、最も過酸化水素に対する選択透過性が高い(PAA/PVS)<sub>2</sub>累積膜とPEM法により作製したUOx累積膜を組み合わせることで過酸化水素検出型尿酸センサの作製を試みた。

まず(UOx/PAA)<sub>n</sub>UOx累積膜の作製条件を検討したところ、PAAを2 mg/mLの8g/L NaCl水溶液、UOxを0.1mg/mLホウ酸緩衝液(pH8.5)で調製して作製した累積膜において最も高い尿酸応答を示した。また、本累積膜を10層積層するとVCおよびAA存在下において尿酸の検出限界は $1.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ となり、本条件下では選択的に尿酸の測定が可能であることが示された。しかし、PAA/UOx累積膜は、2つの欠点を有していることがわかった。まず、PAAの固定化操作時に膜中からUOxが一部脱離する。さらに、膜の基質(UA)の透過性が悪く(PAA/UOx)<sub>n</sub>膜を6層以上積層しても応答電流の増加が見られない。そこで、PAAの代わりにPEIを用いてPEI/UOx累積膜を作製し、これらの欠点の改善を試みた。PEI/UOx累積膜はUAが迅速に膜中へ拡散し、さらに積層操作によるUOxの脱離は観察されなかった。また、PEI/UOx累積膜修飾電極もPAAを用いた場合と同様に、酵素反応で生成した過酸化水素のみを選択的に検出することが可能であった。

このように高分子交互累積膜法を用いて透過制限膜とUOx累積膜を組み合わせることにより、これまで作製が困難であった過酸化水素検出型尿酸センサの作製が可能となった。また、PEM法は作製条件によって物質の透過性を制御することが可能であり、酵素や抗体などの機能性タンパク質を未修飾の状態で累積膜とすることができるので活性の低下を防ぐことが可能となる。これらのことからPEM法は、多くの過酸化水素検出型バイオセンサの感度と選択性の向上にも寄与するものとして期待される。

## 審査結果の要旨

電気化学バイオセンサは環境分析や医療分析において利用価値が高く、高性能バイオセンサの開発研究が広範に実施されている。バイオセンサの高性能化における中心課題のひとつは、試料中に共存する妨害物質に影響されずに目的物のみを計測することのできる高選択性センサを開発することである。

本研究は、高分子交互累積膜という新しいナノ材料を利用した高選択性バイオセンサの開発に関するものである。すなわち、白金電極表面にポリアニオンとポリカチオンを交互に累積固定化した交互累積膜を被覆して物質の選択透過性を付与し、これと固定化酵素を組み合わせることにより高性能バイオセンサを実現した。はじめに、交互累積膜を作製する高分子材料の適否について検討を行い、ポリアリルアミンとポリビニル硫酸を用いるときに最も良好な選択透過膜となることを明らかにした。高分子交互累積膜の作製には、従来から種々の高分子材料が用いられてきたが、選択透過性に関する検討は行われておらず本研究ではじめて得られた成果である。過酸化水素、アスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンについて選択透過性の検討を行い、過酸化水素のみを透過させることに成功した。アスコルビン酸や尿酸は血液中に存在する潜在的妨害物質であり、これらの妨害を除去する方法が確立された点できわめて価値の高い研究成果である。これらの妨害を除去する際には従来はナフィオンなどの高分子材料が用いられてきたが、これらは厚い膜であるために応答が遅くなるなどの不都合があった。一方、本研究で採用した高分子交互累積膜はナノメートルレベルの分子薄膜であるために、センサは速い応答を示した。この点でも、高分子交互累積膜法の優位性を確立したものと評価することができる。

さらに、高分子交互累積膜は固定化酵素担体としても有用であることが示された。すなわち、中性付近で負電荷をもつウリカーゼとポリカチオンを電極表面に交互に累積固定化できることが示された。このようにして固定化されたウリカーゼは累積膜中でも触媒活性を保持しており、尿酸濃度を測定するバイオセンサとして機能することを明らかにした。尿酸自身が妨害物質となるために、尿酸測定用バイオセンサの開発はこれまで困難とされてきたが、本研究は交互累積膜を採用することによりこの問題を解決した。以上のごとく、本研究は高分子交互累積膜を用いて医療用バイオセンサの高性能化に成功し、薬学領域に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。